



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 41 158 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/74
C 12 N 15/70
C 12 N 15/62
C 12 P 21/06

②1 Aktenzeichen: 196 41 158.0
②2 Anmeldetag: 7. 10. 96
④3 Offenlegungstag: 9. 4. 98

DE 196 41 158 A 1

⑦1 Anmelder:
Schmidt, M. Alexander, Prof. Dr., 48149 Münster, DE

⑦2 Erfinder:
Schmidt, M. Alexander, Prof. Dr., 48149 Münster, DE;
Suhr, Martin, Dipl.-Biol., 48149 Münster, DE;
Benz, Inga, Dr., 48149 Münster, DE

⑤5 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

US 53 48 867

SUHR, Martin, et.al.: Processing of the AIDA-I
precursor: removal of AIDA^c and evidence for
the outer membrane anchoring as a β -barrel
structure. In: Molecular Microbiology, 1996,
22, (1), S.31-42;

WU, Ray, GROSSMAN, Lawrence: Methods in
Enzymology,
Recombinant DNA, Academic Press, Inc., New York,
1987, Vol.153, S.492-507;

BENZ, Inga, SCHMIDT, Alexander M.: AIDA-I, the
adhesin involved in diffuse adherence of the
diarrhoeagenic Escherichia coli strain 2787
(0126:H27), is synthesized via a precursor
molecule. In: Molecular Microbiology 1992, 6,
(11), S.1539-1546;

SCHEIN, Catherine H.: REVIEW, Production Of
Soluble Recombinant Proteins In Bacteria. In:
Bio/Technology, Vol.7, Nov. 1989, S.1141-1149;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Transport und Sekretionssystem für gram-negative Bakterien

DE 196 41 158 A 1

Beschreibung

Anwendungsgebiet

Die Erfindung betrifft ein (gen)technisches Verfahren, entsprechend dem Oberbegriff des Anspruches I heterologe Proteine und Proteinfragmente auf der Oberfläche gram-negativer Bakterien zu exprimieren, zu präsentieren und — wenn erwünscht — in das Kulturmedium freizusetzen.

Stand der Technik

Die Expression von Fremdproteinen in *E. coli* oder anderen gram-negativen Bakterien ist sowohl für die biotechnologische Darstellung und Produktion heterologer auch eukaryontischer Proteine oder deren Fragmente als auch für die Darstellung von Vektoren für die Vakzineentwicklung von großer Bedeutung.

Durch geeignete Wahl der verwendeten Transkriptions- und Translationssignale kann eine Überexpression von heterologen Proteinen oder Proteinfragmenten in *E. coli* erreicht werden. Je nach Fragestellung müssen die produzierten Proteine allerdings mehr oder weniger aufwendig gereinigt werden. Häufig und besonders bei sehr starker Überexpression werden die Proteine von der bakteriellen Zelle in sog. "inclusion bodies" (Einschlußkörpern) in denaturierter Form verpackt, so daß eine schwierige und aufwendige Renaturierung erforderlich ist, die nur in seltenen Fällen und auch dann nur in beschränktem Maße gelingt. Zur erleichterten Reinigung werden die Proteine daher häufig mit Hilfssequenzen generiert (z. B. His-Tag etc.), die die Reinigung mit Hilfe einer spezifischen Affinitätschromatographie erleichtern sollen.

Ob diese Hilfssequenzen die Aktivität oder korrekte Faltung eines Proteins beeinflussen, läßt sich nicht vorhersehen und muß im Einzelfall überprüft werden.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten hat man seit längerer Zeit versucht, Systeme zu entwickeln, die Proteine auf die Oberfläche von Bakterien transportieren oder geeignet in das Kulturmedium abgeben. Da das gram-negative Bakterium *E. coli* sowohl biochemisch wie molekularbiologisch besonders gut untersucht ist, waren diese Bemühungen zunächst auf Systeme gerichtet, die in *E. coli* anwendbar sein sollten. Wegen des bei gram-negativen Bakterien besonders komplexen Aufbaus der Zellwand (innere und äußere Membran etc.), waren diese Bemühungen bisher wenig zufriedenstellend und nur bedingt erfolgreich.

Die Systeme, die entwickelt wurden, wie z. B. das Hämolysin-System, benötigen mehrere Gene und eine direkte Fusion mit dem entsprechenden Transportsignal.

Nachteile des Standes der Technik

Die bisher beschriebenen Expressionssysteme führen in der Regel entweder zur Bildung von "inclusion bodies" einhergehend mit einer Denaturierung der Proteine oder sind in gram-negativen Bakterien nur bedingt für einen Export geeignet. Gerade *E. coli* sezerniert nur relative wenige Proteine und die "Manipulation der verschiedenen Transportwege zur Sekretion von Fremdproteinen ist eine gewaltige Aufgabe" [M. A. Blight et al., Curr. Opin. Biotechnol. 5: 468—474 (1994) zitiert in S. C. Makrides "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*" Microbiol. Rev. 60

(Sept.): 512—538 (1996)]. Die verfolgten Strategien benutzen i) die existierenden Wege der wenigen in *E. coli* sezernierten Proteine oder ii) verwenden Signalsequenzen, Fusionspartner, permeabilisierende Proteine, Nährstoffe oder andere Agentien, die einen schädigenden Einfluß auf die äußere Membran ausüben und so zu einer begrenzten Freisetzung aufgrund der Permeabilität ("leakage") führen.

Die erste Anwendung wird durch das Hämolysin-Gen repräsentiert. Allerdings ist dies kein besonders effizienter Prozeß. Gleiches gilt für die induzierte begrenzte Freisetzung durch eine permeabilisierte äußere Membran mit Hilfe von z. B. der Coexpression des "bacterial release proteins" oder des *kil* Gens zur Permeabilisierung der äußeren Membran [S. C. Makrides; Microbiol. Rev. 60: 512—538 (1996)].

Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein einfaches System zu schaffen, mit dem heterologe Proteine oder Proteinfragmente in gram-negativen Bakterien (z. B. *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) auf die Oberfläche der Bakterien transportiert oder nach Maßgabe der spezifischen Anwendung auch in das Kulturmedium freigesetzt werden können.

Lösung der Aufgabe

Diese Aufgabe wird durch das beschriebene AIDA-System mit den in Anspruch I genannten Merkmalen gelöst.

Vorteile der Erfindung

Vorteile dieser Erfindung bestehen in der Verwendung von *E. coli* bzw. für Zwecke der Generation von Lebendvektoren für die (z. B.) orale Immunisierung in der Möglichkeit, auch andere (z. B. attenuierte pathogene) gram-negative Bakterien zur Expression und Präsentation von (Fremd)Proteinen oder Proteinfragmenten auf der bakteriellen Oberfläche zu verwenden. Das im AIDA-System vorhandenen Transportsystem integriert effizient und selbstständig in die äußere Membran. Die im System mögliche Integration von Erkennungsstellen für exogene oder membran-assoziierte, endogene Proteasen (z. B. OmpT) ermöglicht zusätzlich eine leichte Freisetzung des Proteins von der Membran und damit eine einfache Isolierung aus dem Kulturüberstand.

Beschreibung von Ausführungsbeispielen

Das AIDA-System wurde auf der Basis eines von den Erfindern in *E. coli* identifizierten Adhäsionsproteins (AIDA-I) entwickelt. AIDA-I wird aus einem Vorläuferprotein durch autokatalytische Prozessierung abgespalten. Diese Spaltung liefert neben dem Adhäsin AIDA-I ein C-terminales 440 Aminosäuren enthaltendes Fragment, das im folgenden mit AIDA^c bezeichnet wird. AIDA^c besitzt ein aus der DNA-Sequenz abgeleitetes Molekulargewicht von 47.2 kDa und ist in der äußeren Membran von *E. coli* lokalisiert. Die Computer-gestützte Sekundärstrukturanalyse zeigt, daß dieses Protein aus amphipathischen β -Faltblättern aufgebaut ist, die sich in der äußeren Membran vermutlich zu einem "ß-barrel" zusammenlagern. Strukturen dieser Art sind für einige äußere membranproteine Gram-negativer

Bakterien nachgewiesen worden. AIDA^c ist als Transporterprotein an der Sekretion von AIDA-I beteiligt und gehört vermutlich zur Gruppe der Autotransporter.

Durch entsprechende Konstrukte wurde nachgewiesen, daß die Insertion und korrekte Faltung in der äußeren Membran selbstständig und unabhängig von der Anwesenheit des AIDA-I "Passagierproteins" erfolgt und so AIDA^c alle für den Transport in die äußere Membran bzw. für die Freisetzung in den Kulturüberstand notwendigen Signale besitzt und nicht auf akzessorische Hilfsproteine angewiesen ist.

In der Erfindung wird AIDA^c als Teil eines Systems zum Transport und zur Sekretion von Proteinen entwickelt.

Wie gezeigt, genügt die genetische Fusion mit einer beliebigen exogenen Signalsequenz, um einen effektiven Transport in die äußere Membran zu erreichen. Die Signalsequenz wird für den sec-abhängigen Transport durch die innere Membran benötigt. Die korrekte Faltung wird Konstrukte eindeutig durch das Fragmentierungsmuster und die entstehenden Fragmente nach Zusatz exogener Proteasen belegt.

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind als Zeichnung dargestellt und werden im folgenden näher beschrieben:

Abb. 1 Schematische Repräsentation der allgemein notwendigen Elemente eines prokaryotischen Expressionsvektors (modifiziert nach [S. C. Makrides; Microbiol. Rev. 60: 512—538 (1996)]); und

Abb. 2 schematische Beschreibung der besonderen Elemente des AIDA-Systems.

Ein prokaryontischer Expressionsvektor besteht in der Regel aus einem Ensemble genetischer Elemente und Sequenzen in linearer Anordnung auf einem extrachromosomalen genetischen Element (Plasmid). Die notwendigen Elemente sind:

- Promotor: —35 und —10 Sequenzen, die durch einen Spacer von etwa 17 Basen getrennt vorliegen;
- Ribosomenbindungsstelle (RBS): Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) gefolgt von einer A + T-reichen Region (translational spacer) mit einer optimalen Länge von ungefähr 8 Basen;
- Startcodons in *E. coli* (resp. anderer gram-negativer Bakterien) mit einer unterschiedlichen Häufigkeit der Verwendung (codon usage):
 - AUG (91%)
 - GUG (8%)
 - UUG (1%)
- Kodierende Sequenz: offen;
- Stop-Codon: UAA (+ U), UGA, UUG;
- Transkriptionsterminator: stabilisiert die mRNA;
- Repressor (R) moduliert die Aktivität des Promotors und wird durch ein regulatorisches Gen kodiert, das sich entweder auf dem Vektor selbst oder auch auf dem Chromosom befinden kann.

Wie in **Abb. 2** schematisch dargestellt, liegen die besonderen Elemente der Erfindung des AIDA-Systems im kodierenden Bereich.

Auf die Regulations- und Promotorregion (1), für die beliebige Promotoren (z. B. tac, T 7 etc.) eingesetzt werden können, folgt eine für z. B. *E. coli* übliche und optimierte SD-Region (2), an die sich das Start-Codon einer Signalsequenz (3) anschließt.

Daran angeschlossen folgt eine Linker-Region ("mul-

tiple cloning site", MCS) mit Erkennungssequenzen für mehrere verschiedene geeignete Restriktionsendonukleasen (4), die eine "in-frame" Fusion in allen drei Leserastern ermöglichen.

5 Angeschlossen folgt eine kodierende Sequenz (5) für ein kurzes Peptid ("Tag": in der Regel 4—8 Aminosäuren; z. B.: His-Tag, Flag für M1 oder M2 monoklonale Antikörper; eine kurze Aminosäuresequenz, gegen die ein spezifischer monoklonaler Antikörper generiert wurde), das dazu dienen soll, die Reinigung des exprimierten Proteins mit Hilfe der Affinitätschromatographie zu erleichtern.

Auf die Tag-Sequenz folgt eine Erkennungssequenz für entweder eine exogen zugesetzte oder für eine endogene Protease (z. B. OmpT), die nach erfolgter Expression, die Freisetzung des Proteins von der Oberfläche des gram-negativen Bakteriums in das Kulturmedium bewirkt. Eine kryptische neuartige OmpT Schnittstelle ist an dieser Stelle in der Sequenz des AIDA^c-Gens enthalten und kann durch leichte Erwärmung der Bakterien (60°C, 20 min) aktiviert werden. Die Aktivität der endogenen OmpT-Protease wird durch diese Behandlung offenbar nicht beeinflusst.

Daran schließt sich als wichtigstes Merkmal der Erfindung die kodierende Sequenz für das AIDA^c-Protein (6) an, die "in-frame" C-terminal an das zu exprimierende Protein fusioniert wird und für den Transport zur und auf die äußere Membran verantwortlich ist.

Auf dem Vektor folgend (hier nicht gezeigt) sind die gängigen Signale eines Stop-Codons und ein Translations-Terminators, sowie ein Gen zur Expression seines Selektionsmarkers (z. B. Antibiotika-Resistenz) vorgesehen.

Oberbegriff

Bei der Erfindung handelt es sich um ein System genetischer Elemente, die es durch ihr Zusammenwirken ermöglichen, Proteine in gram-negativen Bakterien zu exprimieren und auf die Oberfläche dieser Bakterien zu transportieren. Wenn der Zweck der Expression dies erfordert, können die exprimierten Proteine je nach der speziellen Konstruktion entweder durch eine exogen zugesetzte oder — geeigneter — durch die endogene, membranständige OmpT-Protease in den Kulturüberstand freigesetzt werden.

a) Merkmale des Standes der Technik

50 Die Erfindung bedient sich der aus dem Stand der Technik bekannten Merkmale prokaryotischer Expressionsvektoren, wie sie in **Abb. 1** schematisch dargestellt sind und unter Abschnitt B beschrieben wurden. Dazu gehören:

55 Regulatorische Sequenzen, Expressionspromotoren, Ribosomenbindungsstellen (SD), Signalsequenzen, "multiple cloning sites (MCS)", Tag-Sequenzen, Stop-Codons, Terminatoren und Gene zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdrucks.

Patentansprüche

1. System zur Expression und zum Transport von Proteinen oder Proteinfragmenten auf die Oberfläche gram-negativer Bakterien mit der Möglichkeit, diese Proteine durch Einwirkung einer endogenen bzw. exogenen Protease in den Kulturüberstand freizusetzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß an die

5 kodierende Sequenz des (Fremd)Proteins oder Proteinfragmentes (nachstehend als "Protein" bezeichnet) die für AIDA^c-kodierende Sequenz (nachstehend als "AIDA^c" bezeichnet) im gleichen Leseraster C-terminal fusioniert ist.

2. System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auch einzelne Fragmente oder Sequenzabschnitte oder von der Nukleotid- oder Aminosäuresequenz von AIDA^c abgeleitete Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen verwendet werden.

3. System nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die in AIDA^c enthaltene Schnittstelle für die endogene OmpT-Protease zur Freisetzung des "Proteins" verwendet wird.

4. System nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Schnittstelle für eine exogene Protease vor AIDA^c eingefügt wird.

5. System nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Tag-Sequenz vor die Protease-Schnittstelle eingefügt wird.

6. System nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß vor die Tag-Sequenz eine Linker-Region mit multiplen Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen ("multiple cloning site; MCS") eingefügt wird.

7. System nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß keine Tag-Sequenzen und keine Proteaseschnittstellen integriert sind und die endogene OmpT-Schnittstelle in "AIDA^c" zerstört wird.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

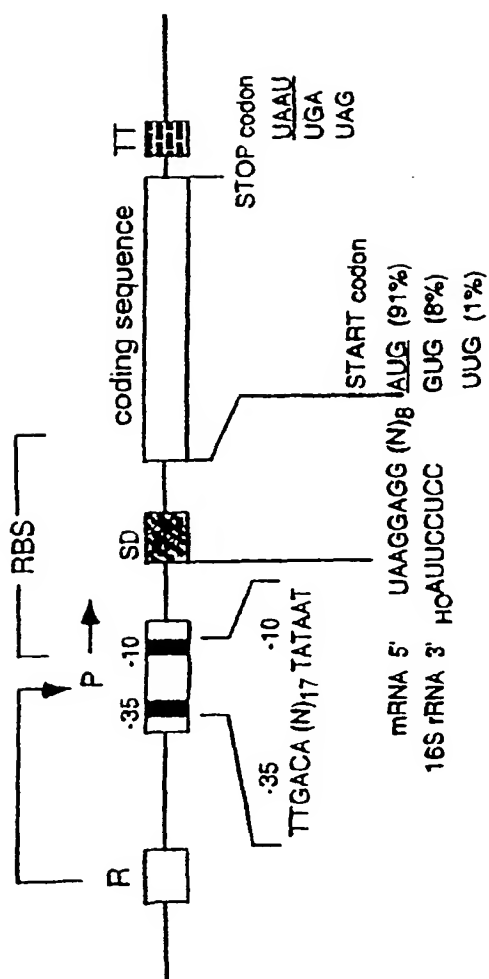


Abbildung 1
(modifiziert nach S. C. Makrides; Microbiol. Rev. 60 (Sept.): 512-538 (1996))

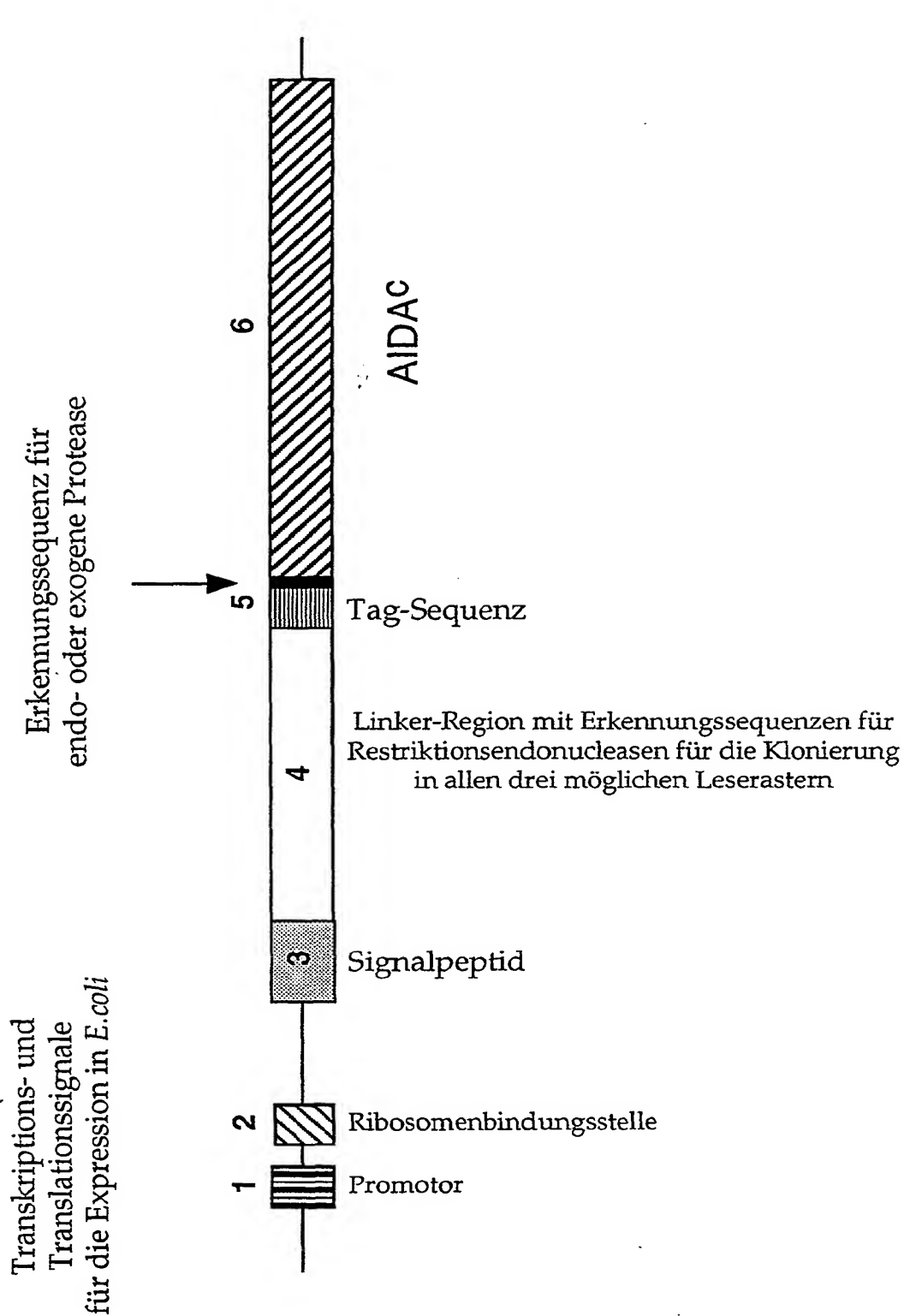


Abbildung 2